

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-244441

(43)Date of publication of application : 24.10.1987

(51)Int.Cl.

B01J 20/22

B01D 15/00

C07K 3/20

C07K 17/02

C07K 17/14

(21)Application number : 61-087838

(71)Applicant : GREEN CROSS CORP:THE

(22)Date of filing : 16.04.1986

(72)Inventor : MOTOKUBOTA TOSHIHARU
MORISE YUTAKA

(54) ANTIBODY IMMOBILIZED CARRIER

(57)Abstract:

PURPOSE: To enhance the availability of a carrier for affinity chromatography in a closed system, by forming an antibody immobilized carrier used for recovering protein from a cell culture solution by applying sterilizing treatment.

CONSTITUTION: An antibody is immobilized on an immobilizing carrier such as cellulose, dextrane, porous glass or chitosan by a known means such as a cyanogen bromide method or a glutaraldehyde method to form an antibody immobilized carrier. This antibody immobilized carrier is sterilized but, as this sterilizing method, heating treatment is pref. and performed under a condition deactivating a virus or bacteria having possibility contained as impurities. For example, sterilization is performed at 55W70° C for about 1W15hr and the antibody immobilized carrier is pref. immersed in an aqueous solution to be treated under a condition of pH5W8.

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244441

⑤Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④公開 昭和62年(1987)10月24日

B 01 J 20/22
 B 01 D 15/00
 C 07 K 3/20
 17/02
 17/14

7106-4G
 K-6685-4D
 8318-4H
 8318-4H
 8318-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑥発明の名称 抗体固定化担体

⑦特 願 昭61-87838

⑧出 願 昭61(1986)4月16日

⑨発 明 者 本 窪 田 利 晴 高槻市南平台5-3-10

⑩発 明 者 森 勢 裕 枚方市東山1-50-5

⑪出 願 人 株式会社 ミドリ十字 大阪市東区今橋1丁目15番地の1

⑫代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

〔産業上の利用分野〕

1. 発明の名称

抗体固定化担体

2. 特許請求の範囲

(1) 滅菌処理を施したことを特徴とする細胞培養液から蛋白質を回収するために使用される抗体固定化担体。

(2) 固定化担体がセルロース、デキストラン、多孔性ガラス、キトサン、アガロース、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸共重合体から選ばれた一種である特許請求の範囲第(1)項記載の抗体固定化担体。

(3) 滅菌処理が55～70℃で1～15時間の加熱処理である特許請求の範囲第(1)項記載の抗体固定化担体。

(4) 加熱処理が糖、糖アルコール、およびアミノ酸から選ばれる少なくとも一種の安定化剤の存在下に行われることを特徴とする特許請求の範囲第(3)項記載の抗体固定化担体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は細胞培養液から蛋白質を回収するために使用される抗体固定化担体に関する。さらに詳しくは、細胞培養液からの蛋白質の精製において、閉鎖系において特に有効に使用することの出来る抗体固定化担体に関する。

〔従来技術〕

抗体固定化担体は抗体を水不溶性担体(抗体固定化担体)に結合させたものであり、生体成分(血液、尿等)、細胞培養液、蛋白抽出液等から特定成分を精製する際に使用されるアフィニティークロマトグラフィー用担体として用いられてきた。

ところで、従来の精製工程は開放系で行われていたため、当該工程における滅菌処理についてはほとんど考慮がされず、また、滅菌の意義もなかった。ところが、最近では開放系ではなく、全ての工程を連続して行う閉鎖系(インライン系)での処理が種々検討されている。このインライン系による精製は自動化、小型化、省力化等の各種の利点がある。また、使用するカラムは必要に応じ

て交換、取替が出来るようにカートリッジタイプのものを用いることも可能となる。

〔発明が解決しようとする問題点〕

このようなインライン系においては、外部からの細菌の侵入がないので、無菌的に精製処理をすることが可能となる。従って、精製工程中の当該ライン系内部からの汚染を防止することは極めて意義あることである。

一方、細胞培養により有用物質を生産する場合、培地に血清等を添加するので、コストの大部分が培地費用となるが、もし有用物質を回収した後の培地が無菌であれば、そのまま再利用が可能となり、培地コストを大幅に軽減することが可能となる。

従って、精製工程中の細菌の汚染を防止すること、特に、有用物質を回収した後の培地を無菌にすることが待望される。

本発明の目的は、そのために使用されうる抗体固定化担体を提供することである。

〔問題点を解決するための手段〕

3

H B c 抗体、癌胎児性抗原 (C E A) 抗体、フェリチン抗体、 β_2 -マクログロビン抗体などが用いられる。

固定化用担体としても公知のものが使用される。好ましくは、たとえば、セルロース、デキストラン、多孔性ガラス〔シリカゲル、コントロールド・プア・ガラス (C P G) 等〕、キトサン、アガロース、ポリアクリルアミド、セラミック、ナイロン、アミノ酸共重合体等が例示される。特に好ましくは、セルロース、多孔性ガラス、キトサン等が使用される。

固定化担体の形状にも特に限定はなく、球状、破砕状、膜状、繊維状、管状、板状等が例示される。

固定化用担体の市販品としては、たとえば、Sephacrose[®] (ファルマシア社)、ホルミルセルロファイン (生化学工業)、C P G (エレクトロ・ニュクレオニック社)、マイクロビーズシリカゲル (富士デビソン)、TRISACRYL[®] (L K B 社)、キトパール[®] (富士紡)、ZETAFINITY[®] (キュー

5

かかる目的を達成するために、本発明の抗体固定化担体は滅菌処理を施したことを特徴とするものである。

本発明において使用される抗体は、アフィニティークロマトグラフィーで使用されうるものであれば特に制限はなく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよい。抗体としては具体的には、たとえば、各種インターフェロン (I F N - α 、I F N - β 、I F N - γ) 抗体、組織プラスミノーゲン活性化因子 (T P A) 抗体、各種インターロイキン (I L - 1、I L - 2、I L - 3) 抗体、コロニー形成刺激因子 (C S F) 抗体、腫瘍壊死因子 (T N F) 抗体、上皮増殖因子 (E G F) 抗体、リンフォトキシン (L T) 抗体、B 細胞成長因子 (B C G F) 抗体、ウロキナーゼ (U K) 抗体、プロウロキナーゼ (P r o - U K) 抗体、エリスロポエチン (E P O) 抗体、カリクレイン (K L) 抗体、アルファフェトプロテイン (A F P) 抗体、アンチトロンビン III (A T - III) 抗体、プラスミノーゲン抗体、H B s 抗体、H B e 抗体、

4

ノ社) などがある。

固定化用担体への抗体の固定化も公知の手段によって行えばよく、たとえばシアン化ブロム法、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、シラン化法等が例示される。

かくして得られた抗体固定化担体は滅菌される。抗体固定化担体を滅菌する方法として、加熱処理、紫外線照射処理などが挙げられるが、好適には、加熱処理が用いられる。加熱処理は夾雑する可能性のあるウイルスまたは細菌が不活化する条件下で行われる。例えば、55 ~ 70℃で1 ~ 15時間程度行われる。また、この時、抗体固定化担体は水溶液中に浸漬し、pH 5 ~ 8 の条件下で処理することが望ましい。

さらに加熱時は固定化抗体の安定化のため安定化剤を存在させることが好ましい。安定化剤としては、糖、糖アルコール、アミノ酸などが用いられる。これらは併用することもできる。

糖としてはサッカロース、マルトース、ラフィノースなどが、糖アルコールとしてはソルビトール

6

ルなどが、アミノ酸としてはグリシン、アラニン、リジン、アルギニンなどが用いられる。

その添加量は、糖、糖アルコールで30～90 w/v%、アミノ酸で5～20 w/v%程度が例示される。

滅菌処理した抗体固定化担体はpH 6～8の低イオン強度の水性溶媒を封入し、4℃前後で保存しておくことが望ましい。この場合、公知の防腐剤（例えば、アジ化ナトリウムなど）を用いることもできる。

本発明の抗体固定化担体は、通常カラムあるいはカートリッジとして用いられる。

滅菌処理を施した抗体固定化担体の精製工程への導入は、たとえば次のようにして行うことができる。

培養容器（タンク等）や粗製バルクプールタンク（無菌）の出口ラインにフィルターを接続し、その後に抗体固定化担体を、たとえばカラムまたはカートリッジの態様として接続する。フィルターは処理溶液中の細胞、細胞片、不溶性物の除去

を目的とし、その孔径は、処理溶液に応じ選択できる。フィルターも滅菌されていることが好ましく、滅菌処理、たとえばオートクレーブ滅菌やスチーム滅菌が可能な材質を選択する。上記のシステムは容易に構築でき、当該システムを通過した試料液、たとえば培養液は無菌であり、そのまま再利用が可能である。

〔作用・効果〕

本発明により得られた固定化担体は滅菌処理が施されており、精製工程に、試料溶液を汚染することがない。

従って、本発明による滅菌処理を施した固定化担体は、たとえば閉鎖系（インライン系）でのアフィニティクロマトグラフィー用担体として極めて有用である。すなわち試料溶液（培養液等）をフィルター（通常の方法により滅菌したもの）に通液し、精製対象物中の細胞、細胞片、不溶物等を除去した後、本発明の滅菌固定化担体を連続して、有用物質を取り除いた試料液は無菌であるため再利用が容易となり、その結果、有用物質の生

産コストを大幅に低減することができる。

〔実施例・実験例〕

本発明を詳細に説明するために実施例、実験例を挙げるが本発明はこれらによって限定されるものではない。

以下に示した滅菌処理の実施例においては、大腸菌K12株を使用し、その滅菌効果の判定には、ミリポア社製：ウォーターサンブラ（Coli-count）によるコロニー数測定によった。

実施例1

精製IFN- α をウマに免疫して得られたポリクローナルIFN- α 抗体をシラン化法で処理したシリカゲル（富士デビソン社製：マイクロビーズシリカゲル、500 Å）固定化し、このゲルを30～90 w/v%の糖、糖アルコール及び5～20 w/v%のアミノ酸水溶液（各20 ml）に固定化ゲル（各2 g）を懸濁した。その後、大腸菌の希薄溶液を添加し、pH 7の条件下、60℃で1～15時間加熱した。加熱処理後の各懸濁液についてコロニー数を測定した。その結果を表1に示した。

表1：抗体固定化担体の糖、糖アルコール及びアミノ酸存在下での滅菌

60℃加熱時間(hr)		1	3	15
添加剤：濃度				
サッカロース	30%	0	0	0
	90%	2	0	0
マルトース	30%	4	0	0
	90%	3	0	0
ラフィノース	30%	3	0	0
	90%	0	0	0
ソルビトール	30%	0	0	0
	90%	2	0	0
グリシン	5%	0	0	0
	20%	4	0	0
アラニン	5%	2	0	0
	20%	4	0	0
アルギニン	5%	2	0	0
	20%	4	0	0
リジン	5%	0	0	0
	20%	3	0	0

加熱処理前の大腸菌濃度：7811コロニー/ml
表中の数字は加熱処理後の大腸菌（生菌）濃度
（コロニー/ml）

実施例 2

60 w/v %の糖、糖アルコール及び20 w/v %のアミノ酸水溶液（各200 ml）に大腸菌の希薄水溶液を添加した溶液を、モノクローナルIFN- γ 抗体をCNBr活性化法により固定化したZETAFFINITY[®]（キュノ社製）カートリッジに循環し、pH7で55～70℃で10時間加熱処理を実施した。加熱処理後、循環液の大腸菌（生菌）濃度を測定した。その結果、表2に示すように、55～70℃での加熱処理後、大腸菌（生菌）は検出されなかった。

（以下余白）

表2：抗体固定化担体の10時間加熱処理による滅菌

安定化剤	加熱温度℃	55	60	70
ソルビトール	60%	1	0	0
サッカロース	60%	0	0	0
グリシン	20%	0	0	0
リジン	20%	1	0	0

加熱処理前の大腸菌濃度：4594コロニー/ml

表中の数字は加熱処理後の大腸菌（生菌）濃度

（コロニー/ml）

実施例 3

抗体固定化担体の加熱滅菌後、固定化担体の安定性を調べた。

(1) ポリクローナルIFN- α 抗体固定化シリカゲルを60 w/v %ソルビトール水溶液中でpH7に調製し、60℃、10時間加熱処理した後、IFN-

11

α の精製を行い、IFN- α 回収率を非加熱の抗体固定化ゲルと比較した。

加熱、非加熱の抗体固定化シリカゲルをカラム（10×20mm）にそれぞれ充填し、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した後、粗製IFN- α をチャージし、IFN- α を担体に吸着させた。その後、未吸着蛋白質などを、前述の緩衝液で洗浄した後、0.1Mクエン酸緩衝液（pH2.0）で溶出を行い、IFN- α を回収した。その結果を表3に示す。加熱処理後も抗体固定化担体は抗原結合能を保持していた。

表 3

	IFN- α (IU)	回収率 (%)
粗製 IFN- α	2200×10 ⁴	100
加熱処理カラム	1760×10 ⁴	80
非加熱カラム	1720×10 ⁴	78

(2) モノクローナルTNF抗体を過ヨウ素酸法に

13

12

より固定化したホルミルセルロファイン（生化学工業製）を60 w/v %蔗糖水溶液中でpHを7に調製し60℃、10時間の加熱処理を行った。加熱、非加熱の抗体固定化ホルミルセルロファインをそれぞれカラム（10×20mm）に充填し、TNFの精製回収率を比較した。0.1Mリン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化したカラムに粗製TNFをチャージした後、未吸着蛋白質を前述の緩衝液で洗浄した。カラムに吸着したTNFは3.5M KSCN（pH8.0）溶液で溶出回収した。その結果を表4に示す。

表 4

	TNF (IU)	回収率 (%)
粗製 TNF	583×10 ⁴	100
加熱カラム	460×10 ⁴	79
非加熱カラム	431×10 ⁴	74

(3) モノクローナルIFN- γ 抗体を固定化し

14

手続補正書 (自発)

昭和61年6月13日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和61年特許願第87838号

2. 発明の名称

抗体固定化担体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

4. 代理人 ㊟541

住所 大阪市東区平野町4丁目53番地3

ニューライフ平野町 406号

Tel (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士(8079) 高島 一



5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

- (1) 明細書第5頁第7行、「ブア」を「ボア」に訂正する。
- (2) 明細書第5頁第10行「キトサン」を「キトサン」に訂正する。
- (3) 明細書第7頁第6行、「担体」を「担体は、」に訂正する。



た ZETAFFINITY® カートリッジ(キュノ社製)に、pH7の条件下で60℃に加熱した20w/v%グリシン水溶液を10時間循環させ、加熱処理を行った。加熱、非加熱の抗体固定化カートリッジを用い、粗製IFN-γの精製を行った。

0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)で平衡化したカートリッジに粗製IFN-γをチャージし、IFN-γを吸着させた。前述の緩衝液でカートリッジを洗浄した後、3.5M KSCN(pH8.0)溶液でIFN-γを回収した。表5にその結果を示す。

表5

	IFN-γ (IU)	回収率(%)
粗製IFN-α	3200×10^4	100
加熱カートリッジ	2944×10^4	92
非加熱カートリッジ	3104×10^4	97

特許出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高島 一



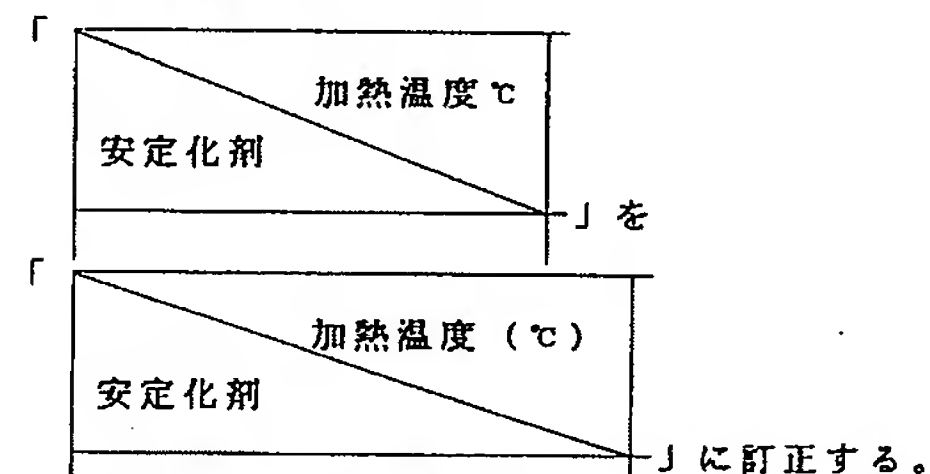
15

1

(4) 明細書第8頁第16行、「方法」のあとに「である高温高圧蒸気」を加入する。

(5) 明細書第11頁第5行、「CNBr活性化法」を「過ヨウ素酸法」に訂正する。

(6) 明細書第12頁表2中、



(7) 明細書第13頁最下行、「過ヨウ素酸法」を「ホルミル化法」に訂正する。

(8) 明細書第14頁第2～3行、「調製」を「調整」に訂正する。